

メダカ卵形成期の付着毛の微構造と発生

金沢大学医学部解剖学第一講座 (主任: 本陣良平教授)

東 元 瑞 子

(昭和58年12月16日受付)

メダカ (*Oryzias latipes*) の卵胞の発生と付着毛 (AF) の微構造を微細小管の回転重ね焼き法、光回折法、および、ビンブラスチン処理の技法を用いて、走査型と透過型電子顕微鏡により検索した。卵膜は、顆粒状物質から成る外層と線維状物質から成る内層に区分され、卵形成期に、卵母細胞のゴルジ装置に由来する径 100~200 nm の、限界膜が平滑な有芯小胞によって作られる。AF は、卵膜外層に付着した円錐形の線維状の突出物で、卵形成期において基部、頸部、終部から構成されている。AF の基部は半球状の突出物で、微細顆粒状物質から成るが、卵形成後期では卵膜内層と癒合し、成熟卵では消失している。AF の頸部は、卵膜外層の延長である円筒状の外縁で覆われている。AF の頸部と終部には、径約 220 Å の微細小管が密にパッキングされている。微細小管壁は、横断像では径約 50 Å の粒子が 13 個あるいは 14 個並んでおり、縦断像では粒子が線状配列をなしている。この粒子はチューブリン分子で、タンパク質から成り、電子密度大な無定形物質中に埋まって、微細小管壁を形成している。AF の微細小管は、卵形成期に卵胞上皮細胞中で作られる。微細小管の前駆体は、卵胞上皮細胞内のゴルジ装置に由来する crystal-vesicle (CRV) として出現する。硫酸ビンブラスチンを腹腔内に注射すると、vinblastine-tubulin crystal が卵胞上皮細胞内に形成される。これは、正常な卵形成において、卵胞上皮細胞内に多量のチューブリン分子が存在することを示唆するものである。

Key words 付着毛, 微細小管, 卵形成, ビンブラスチン, メダカ

メダカ成熟卵子は、厚さ約 20 μm の硬い卵膜で覆われている。卵膜からは、放射状に「絨毛」と称する毛状の構造物が延びている。絨毛は卵子の植物極側では長く、この部のもののみを「付着毛」と呼んでいる¹⁾。絨毛と付着毛は長さが異なるにすぎず、内部の微構造が全く同一なので、著者は両者を総括して付着毛 (attaching filament, 以下 AF と略) と呼ぶ。一般に、AF に相当する構造物は卵子の呼吸、産卵時の卵子の流去を防ぐ錨の役割、さらには、衝撃を受けた際の緩衝作用があると考えられている²⁾。哺乳類の場合と対比すると、メダカ卵膜は透明帯に、AF は胎盤の絨毛に相当する³⁾。メダカ AF 内部の微構造に関して、Yamamoto⁴⁾は並行な交叉線模様をもつ結晶構造であるとし、Tsukahara⁵⁾は直径 180~200 Å の微細小管が長軸方向に配列した構造であると報じている。しかし、

これらの報告には不明な点が多く、AF 形成の各種段階における卵胞の微構造変化の検索に乏しく、とくに、卵母細胞と卵胞上皮細胞との AF の形成に対する役割が明確でない。

著者は、メダカ卵巣内の種々の発達段階の卵胞と、卵巣腔内に排卵された成熟卵子について、その微構造を光顕ならびに透過型・走査型電顕によって検した。さらに、酸性フォスファターゼ活性の検出および燐タングステン酸のブロック染色による検索、レーザーによる光回折、抗癌剤である硫酸ビンブラスチン投与実験によって、AF の発生機序の解明を試みた。

材料および方法

実験動物としては、成熟ヒメダカ *Oryzias latipes* を使用した。光顕検索には、卵巣を取り出し、メダカ卵

Ultrastructure and Development of Attaching Filaments during the Oogenesis of the Medaka, *Oryzias latipes*. Mizuko Higashimoto, Department of Anatomy (Director: Prof. R. Honjin), School of Medicine, Kanazawa University.

母細胞用 Ringer 液⁹⁾中でしばらく洗い、固定液に投じた。電顕検索用には、Ringer 液中へ卵巣を取り出し、実体顕微鏡下で種々の大きさの卵胞を選別し、直ちに固定液に投じた。また、電顕用の成熟未受精卵（成熟卵子）の採取には、あらかじめ前日に腹部に卵塊をつけている雌のメダカを雄より分離し、翌日の早朝に腹部を切開し、実体顕微鏡下で、卵巣腔に到達している健全な成熟未受精卵のみを選び採って、固定液に投じた。光顕用標本の作製には、10%ホルマリン2～3日間固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

超薄切片法による透過型電顕用標本の固定には、次の2法によった。1. Karnovsky⁷⁾の変法によるパラフォルムアルデヒド・グルタルアルデヒド・オスミウム混液前固定24時間、後固定2～3時間、2. 5%グルタルアルデヒド・0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.2)による前固定1時間、Daltonの重クロム酸カリウム・オスミウム混液⁸⁾による後固定1.5時間。上記の2法とも、ついで、エタノール系列で脱水、エボン812に包埋し超薄切片とし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色⁹⁾を施した。同時に約1 μ m切片を作り、トルイジンブルー染色を施し、光顕による卵胞の発達段階の同定に資した。

走査型電顕用標本の作製には、次の2法によった。

1. 臨界点乾燥法：2.5%グルタルアルデヒドで前固定2時間、1%オスミウムで後固定1.5時間、イソ・アミルアセテート置換ののち液体炭酸による臨界点乾燥、カーボン・パラジウム蒸着。2. 凍結真空乾燥法：2.5%グルタルアルデヒドで12時間固定、10%グリセリン浸透1時間、20%グリセリン浸透2.5時間、液体窒素による凍結、Eiko FD-2A型凍結試料処理装置で高真空による乾燥、白金パラジウムとカーボンの回転蒸着、HUS-5GB型真空蒸着装置によるカーボン再蒸着。上記の2法とも、成熟卵子の卵膜表面をHFS-2型走査電顕で観察した。

AFの横断像において、内部の微細小管壁を構成するチューブリン分子の数を求めるため、透過型電顕によって得た写真に、回転重ね焼き法¹⁰⁾を施して観察した。この際、 $n=11$ から $n=15$ のものについて比較検討を行なった。

AFの形成に関与する構造の組織化学的特性の検索は次の2法によった。1. 酸性フォスファターゼ活性を検出するための、 β -グリセロリン酸ナトリウム・硝酸鉛浸漬法¹¹⁾。なお硝酸鉛を含まない浸漬液を用いて同一の処置を施し、対照とした。この方法によると、組織内の活性部位に砂粒状の燐酸鉛の沈澱が生ずる。2. 飽和燐タングステン酸エタノール溶液のブロック染色

法¹²⁾。この方法によると、微構造に密接な関連をもつ糖タンパクが染め出される¹³⁾。

さらに、卵胞上皮細胞内の密度大な小胞内の結晶構造を解析するために、透過型電顕撮影像の反転像について、Eiko LD-10光回折装置を使用しHe-Neガス・レーザー光（波長0.6328 μ m）による光回折を行なった¹⁴⁾¹⁵⁾。この方法によると対称性の回折スポットが得られ、構造の周期性・対称性を知ることができる。

AFを構成する微細小管タンパクであるチューブリン分子の存在部位を知るため、以下の検索を行なった。7月上旬の産卵期に、毎朝産卵している健全なメダカを選別し、産卵前15～16時間に、前述のRinger液に10⁻²Mの割合に硫酸ビンブラスチン（SIGMA Chemical Company USA, 結晶状）を溶かした液0.05 mlを腹腔内に注射し、他のメダカと隔離しておく。なお、対照としてRinger液のみ0.05 ml注射したものをも検した。次に、ビンブラスチン注射後19時間と25時間および対照のメダカの卵巣を2.5%グルタルアルデヒドで前固定12時間、2%オスミウムで後固定1時間後、超薄切片法による透過型電顕観察を行なった。この方法によると、ビンブラスチンは細胞質内に存在するチューブリン分子と結合し、vinblastine-tubulin crystalが形成され、電顕下で観察できる。なお、すでに形成が完了し、構造的に安定となった微細小管は、ビンブラスチンの影響を受けない^{16)~25)}。

成 績

I. 付着毛（AF）の微構造

メダカ成熟卵の卵膜表面を走査型電顕で観察すると、植物極側に長さ2 cmを超えるAFが約20本付着しており、植物極を除く卵膜表面全体には、長さ約0.2 mmの短いAFが約100本付着している（写真1）。

成熟卵のAFの卵膜からの突出部は、頸部と終部とに区分される。頸部は太さ約10 μ m、長さ約60 μ mの円柱状を呈し、無構造の被膜で覆われている（写真2）。頸部の大きさは、植物極における長いAFと他の部における短いAFとの間に著明な差がない。終部の長さは、植物極のAFでは約20 mm、植物極を除くAFでは約0.15 mmで、太さは両者とも先端部へと徐々に細くなっている。成熟卵では、卵形成過程に見られた基部は縮小して卵膜の一部となり、識別できなくなる。

AFを超薄切片法の透過型電顕で観察すると、径約200～280 Åの微細小管が、頸部の最卵子側、すなわち卵膜との接点から終部の先端まで、長軸方向に互いに並行に密に配列している（写真3）。また、終部が徐々に細くなっていく途中では、外側に位置する微細小管の末端が外部に開いている。

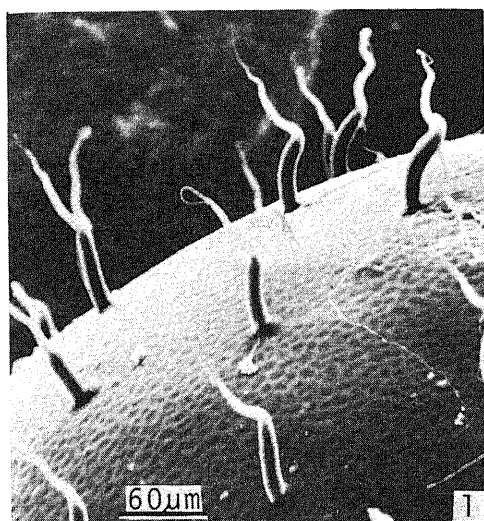


Photo. 1. Scanning electron micrograph of attaching filament (AF) in the ripe egg, extending from the surface of egg envelope. Short and long AF are seen. Freeze drying method. $\times 200$.

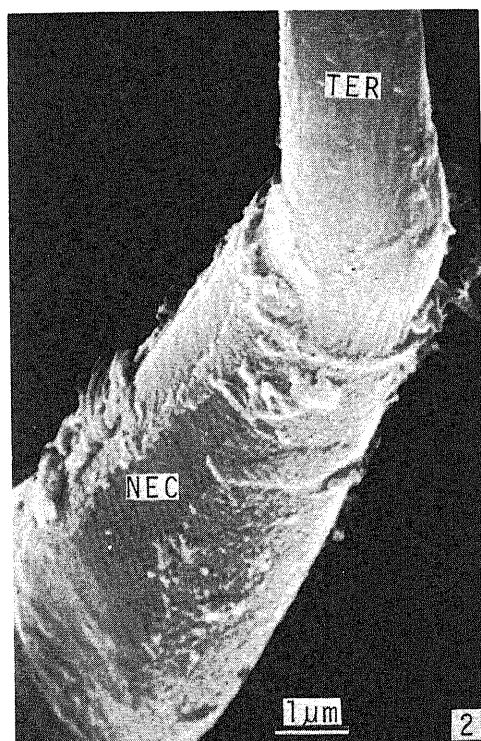


Photo. 2. Scanning electron micrograph of the neck segment (NEC) and the terminal segment (TER) of AF in a higher magnification. Bundle of microtubules in NEC is covered with the ridge which is continuous connection with the outer layer of egg envelope. Critical point drying method. $\times 5,000$.

燐タングステン酸のブロック染色後、ウランと鉛の電子染色を施した試料の透過型電顕観察では、横断像において、微細小管壁に径約 50 \AA の粒子の存在が観察される。微細小管内部は中空ではなく、管腔のほぼ中央に径 $100 \sim 200 \text{ \AA}$ の顆粒状物質が存在する。縦断像では、微細小管壁の多数の粒子が写真上に投影されるので、管の中心の顆粒状物質を識別することは困難である。また、横断像で見ると、微細小管は電子密度大な物質中に埋まっている（写真4）。

AFの横断像における数個の微細小管の回転重ね焼き法による検索から、 $n=13$ および $n=14$ のとき微細小管壁に最も鮮明な粒子の配列が現われた（写真5）。このことは、微細小管を一周するのに、13個あるいは14個の粒子が並んでいることを示している。

II. 卵形成期の卵胞の微構造

卵胞の成熟過程を便宜上次の5期に区分した。括弧内に卵胞の直径を記載する。1. 第1期（約 $100 \mu\text{m}$ ）、2. 第2期（約 $300 \mu\text{m}$ ）、3. 第3期（約 $600 \mu\text{m}$ ）、4. 第4期（約 $800 \mu\text{m}$ ）、5. 第5期（約 1.1 mm ）。

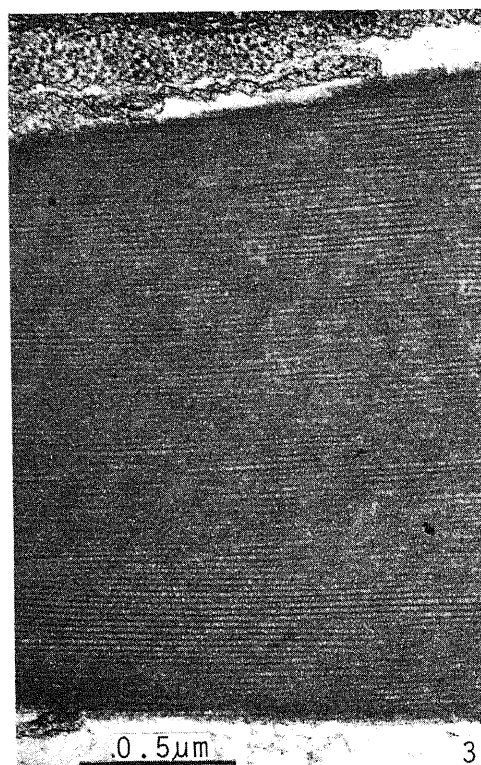


Photo. 3. Transmission electron micrograph of longitudinal section of the terminal segment of AF. Numerous microtubules are tightly packed in parallel with the axis of AF. $\times 42,000$.

以下、各段階の卵胞の微構造特徴を、卵胞の光顕所見、卵母細胞、卵膜、卵胞上皮細胞のそれぞれの電顕所見の順に記述する。

1. 第1期

光顕で見ると、卵母細胞の核は球形で、核膜の凹凸は少ない。多数の核小体が核膜の内面に沿って配列し、胚斑の形態をとる(写真6a)。電顕で見ると、卵母細胞表面は平滑で、マイクロビリーをもたず、卵胞上皮細胞とは約130 Åの細隙をもって密接している。卵膜やAFの出現は認められない。また、卵母細胞の細胞膜直下には、ピノサイトーシス小胞が稀に認められる。卵胞上皮細胞は単層扁平で、扁平な核が細胞体の大半を占めている。細胞質には、ミトコンドリア、粗面小胞体、遊離リボソームがわずかに散在するにすぎない。

2. 第2期

卵母細胞の核に溝入が多くなり、核膜に近接して存在する核小体は不整な形となり、核小体内に空隙が認められる。細胞質には、卵黄粒、表層胞、脂質滴が出現する。卵母細胞の細胞膜の外面に、強く光を屈折する帯状の層が出現する。これは将来卵膜の外層になるものである。また、卵胞上皮細胞間には、大小種々の

AFの断面が出現する(写真6b)。

この期の卵胞を電顕で観察すると、卵母細胞の最表層部の全周にわたって所々に斑状の電子密度小なektoplasmが存在する。Ektoplasmには厚さ0.3~0.4 μm, 幅2.0~2.4 μmにわたり微細線維が層状に存在している。Ektoplasm直下の卵細胞質には、ミトコンドリアやゴルジ装置が発達している。また、この部の細胞表面には、かなり太い指状の突出があり、その表面に電子密度大な物質がわずかに沈着しはじめている。後にも述べるが、これは卵膜の外層に連なるAFの接着部になる。卵母細胞と卵胞上皮細胞とは、所々において約250 Åの間隙を隔てて密接している(写真7)。上記の構造の形成が進み、電子密度大な物質(AFの接着部)の厚みが約0.06 μmとなると、卵母細胞からの突出は不著明となる。さらに形成が進むと、外面の電子密度大な物質(AFの接着部)の厚みは約0.1 μmとなり、卵母細胞表面の所々に丘状の隆起として認められる。これの外側に、将来AFの頸部が形成されることになる。この丘状の隆起部直下には、なおektoplasmがあり、その下方に発達したゴルジ装置が存在する(写真8)。

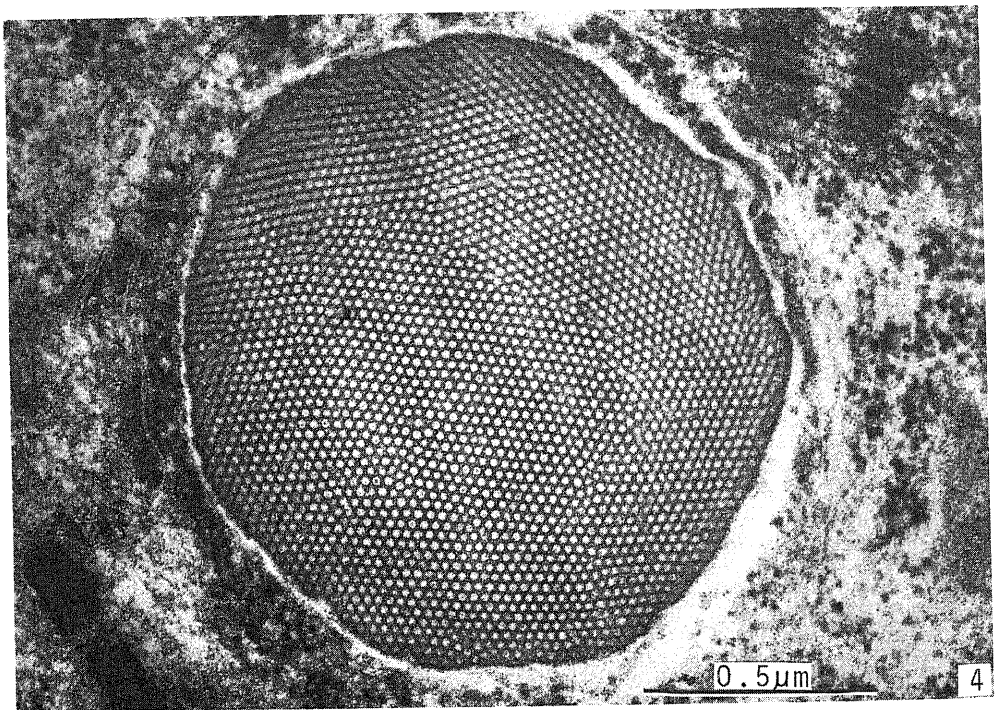


Photo. 4. Transmission electron micrograph of transverse section of the terminal segment of AF. Numerous microtubules are embedded in the amorphous material. Electron dense particles of about 50 Å in diameter are seen on the wall of the tubules. A dense material of about 100 to 200 Å in diameter is seen in the center of the tubules. ×60,000.

卵形成がさらに進んだ期にはいると、卵母細胞から約 $0.1\ \mu\text{m}$ の間隔で棍棒状のミクロビリーが無数に突出し、その間に電子密度大な物質が約 $1\sim 3\ \mu\text{m}$ の厚さになるまで帯状に沈着する。これが、将来卵膜外層

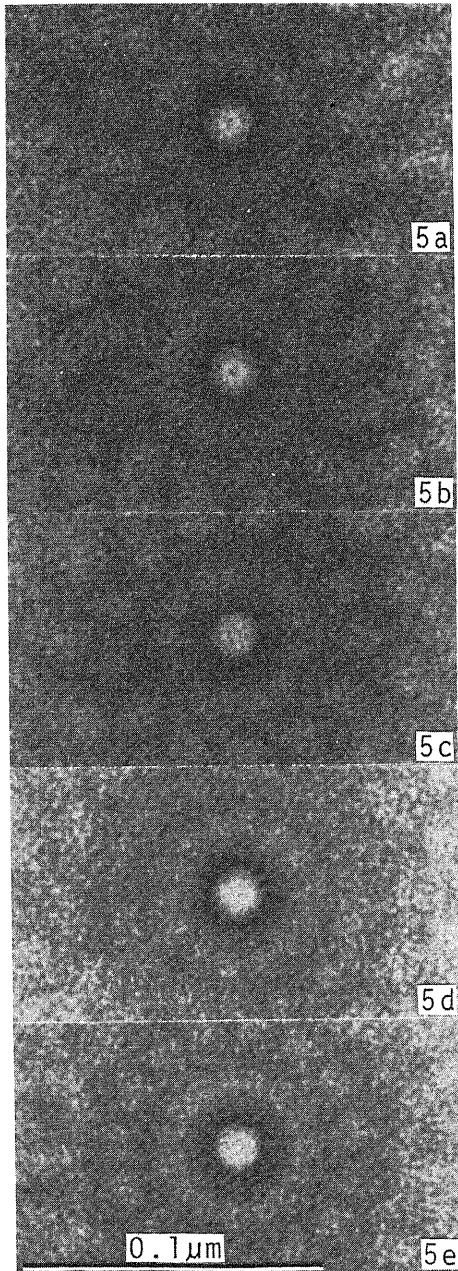


Photo. 5. Rotation diagrams of microtubules; $n=11$ (a), $n=12$ (b), $n=13$ (c), $n=14$ (d) and $n=15$ (e). Round particles (dots) appear at $n=13$ and $n=14$. $\times 400,000$.

になる。さらに、AFの接着部である丘状の隆起部の円柱状の外側部が外方へ堤状に伸びてAF頸部の被膜を形成する。この間この円柱状の被膜の内側に、これに包まれるような形で、卵胞上皮細胞から微細小管が形成され、頸部を構成する。また、このときAF基部は卵母細胞側へ軽く陥没する。上記のAF頸部の被膜は、約 $60\ \mu\text{m}$ の高さまで伸び、AF頸部の外面を完全に包むことになる(写真9)。これが走査電顕観察に際し認められた頸部の被膜に相当する(写真2)。

卵膜外層の形成が完成に近づくとき、これと卵母細胞との間隙に、卵膜外層より電子密度小な、微細線維状物質から成る卵膜内層が沈着し始める。なお、この時期では、卵膜外層と内層との厚さがほぼ等しく、約 $3\ \mu\text{m}$ である。AFが卵膜と接着する部では、卵母細胞方向に物質塊が膨隆して、碗状の形態をもつ基部が形成される(写真10)。燐タングステン酸ブロック染色を施した試料の超薄切片を作成し、電子染色を施さないで観察したところ、卵膜外層、AFの基部、および頸部の被膜がほぼ同一の電子密度を示し、これら3者が同一の物質から成ることを暗示している(写真11)。

卵胞上皮細胞は、扁平から立方形となり数層をなす。細胞間には多数のデスモゾームが見い出される。核は大きく明調で核小体が著明である。細胞質には、粗面小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置、ポリゾームが発達し、ゴルジ装置には、内部に電子密度大な物質を含むゴルジ小胞が認められる。卵胞上皮細胞の細胞間隙にAFの断面が認められる。

3. 第3期

卵母細胞の核は多数の突起を出し、核小体内の空隙が著明となり、さらには核小体が千切れて核膜の内面に分散する。これは、卵母細胞の代謝が活発であることを示している。核の周囲には、大量の脂質滴が沈着し、卵母細胞質には、大小種々の卵黄粒、表層胞が分布する。この時期に表層胞の増加が著しい(写真6c)。この表層胞は、受精のときに精子の侵入点を引き金にして連鎖的に崩壊し、受精膜を形成する役割をもつ²⁶⁾。

卵母細胞の細胞膜と連続して、あるいは細胞膜直下に次の2種の小胞が観察される。1. 被覆小胞(coated vesicle): 限界膜の外面に長さ約 $0.02\ \mu\text{m}$ の剛毛を有し、限界膜の内面に密着して、やや電子密度大な無定形物質が含まれている。この小胞の径は $0.1\sim 0.2\ \mu\text{m}$ である。2. 有芯小胞(cored vesicle): 径約 $0.2\sim 0.3\ \mu\text{m}$ の平滑な小胞で、内部に限界膜とは約 $0.01\ \mu\text{m}$ のすき間をもち、電子密度大な芯状構造を有する。この小胞の外形は不規則で、種々の方向に限界膜の膨出を示す(写真12)。卵母細胞の粗面小胞体の

内腔が拡張し、発達したゴルジ装置が細胞質の表層にまで広がり、ゴルジ装置から分離したと思われる小胞内に、電子密度大な物質が観察される(写真13)。上記の有芯小胞はこの小胞に由来する。

卵膜内層の厚みが増加し、これを構成する微細線維が卵母細胞の接線方向に折り畳まれて堆積した構造を呈し、その中を電子密度大な卵母細胞のミクロビリーと、中等度の電子密度の卵胞上皮細胞のミクロビリーとが貫通している。ミクロビリー内には、微細線維が長軸方向に走っている。

卵胞上皮細胞の層は厚くなり、約 $6\mu\text{m}$ に達する。細胞の核は明調で、著明な核小体が数個ある。発達した粗面小胞体、ミトコンドリア、遊離リボソーム、発達

したゴルジ装置が認められ、ゴルジ小胞内に中等度の電子密度をもつ径約 $0.2\sim0.3\mu\text{m}$ の物質が含まれている。径約 $0.6\mu\text{m}$ の大きな小胞では、電子密度大な物質塊や中等度の電子密度をもつ無構造の物質に混じて、第III章に述べるような結晶構造が観察される(写真14)。卵胞上皮細胞の細胞膜直下には、被覆小胞が無数に認められ、結晶構造を有する小胞と並んで、細胞膜と連続し、外部に開口している(写真15)。卵膜に接する最内側に位置する卵胞上皮細胞相互間には、よく発達したデスモゾームが並んで認められる。デスモゾームの接着斑から、径約 20nm の張原線維が約 $0.06\mu\text{m}$ の長さまで延び、ここで細胞側壁の細胞膜に並行する張原線維束に終わっている。

植物極のAFの終部は、この期に入ると著明に長くなる。エポソニ包埋厚切り連続切片でAFの走行を追求した結果、AFの頸部は卵膜に対して直交あるいは斜めに外方に伸び、卵胞上皮細胞層の下半分の高さに達すると、被膜をもたない終部となる。植物極側のAFは、この部位で約 $0.1\sim0.2\text{mm}$ の距離まで卵膜の接線方向に横走り、卵胞上皮細胞層の上半分で幾重にも折り畳まれながら、徐々に細くなる。植物極以外の部のAFは終部が約 0.15mm で、上記のような横走や折り畳みがない。

4. 第4期

第3期に卵の中央部にも存在していた小型の卵黄粒、表層胞、脂質滴がすべて表層部の細胞質へ移動し、卵母細胞の中央部は卵黄塊のみで占められるようにな

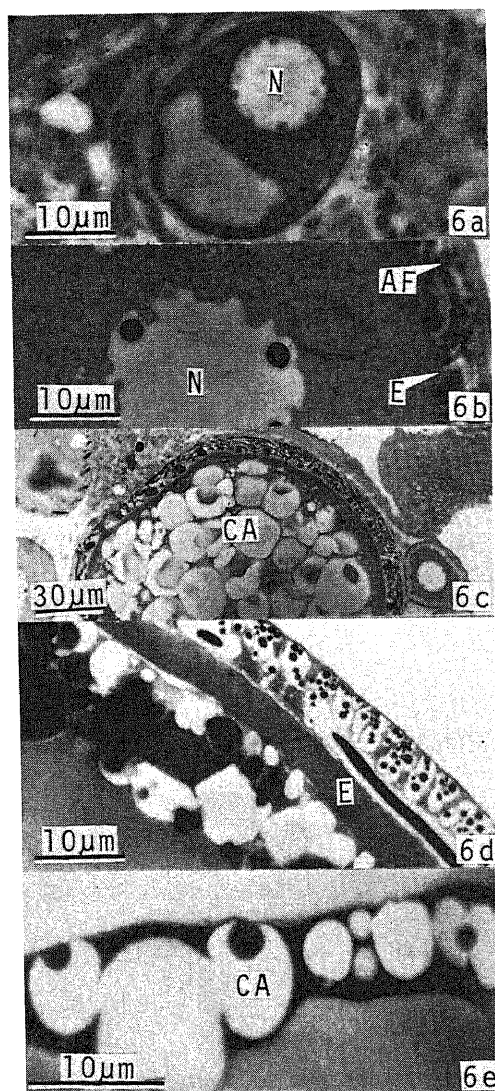


Photo. 6. Photomicrographs of developmental follicles stained by toluidine blue, during the oogenesis of the medaka. 6a: Stage 1 follicle. Note the round nucleus (N) and numerous nucleoli. $\times 1,200$ 6b: Stage 2 follicle. Note the appearance of AF and egg envelope (E). Nuclear membrane is undulated and nucleoli are vacuolated. Yolk granules, cortical alveoli and lipid droplets appear in the ooplasm. $\times 1,200$. 6c: Stage 3 follicle. Numerous AF are observed in the intercellular space along the follicular epithelial cells. Many of cortical alveoli (CA) are deposited in the entire oocyte. $\times 300$. 6d: Stage 4 follicle. Note the thick egg envelope (E) and central yolk mass. Various size of numerous yolk granules, cortical alveoli and of lipid droplets are packed in the cortical ooplasm. $\times 1,200$. 6e: Stage 5 (ripe unfertilized egg). Cortical alveoli (CA) are linearly arranged in the thin cortex of ooplasm. Yolk granules fuse into the central yolk mass. Egg envelope and AF can not be seen, because they have been removed before the fixation. $\times 1,800$.

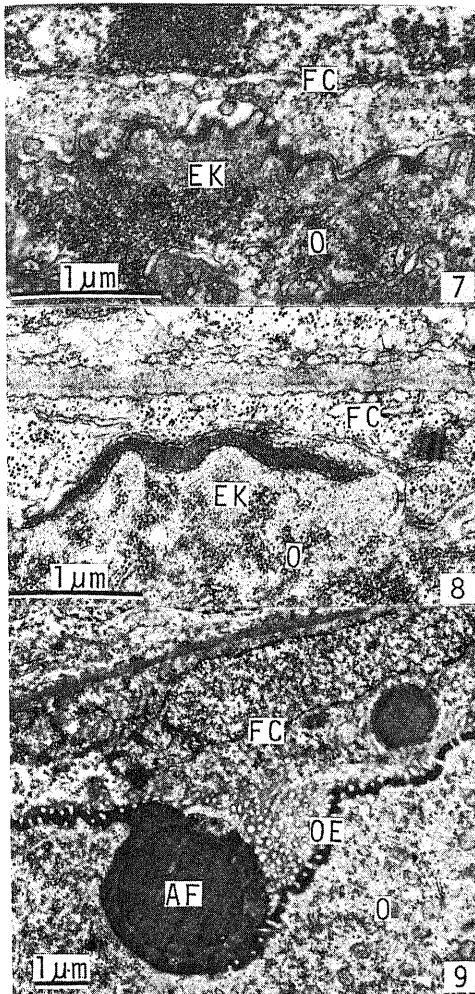


Photo.7. Follicle in the beginning of stage 2. Electron dense material deposits on the microvillus projection of the oocyte (O), under which ectoplasm (EK) of the oocyte is observed. FC, follicular epithelial cell. $\times 20,000$.

Photo.8. Follicle in the beginning of stage 2. Electron dense material deposits on the protrusion of the oocyte (O). Microvilli are not seen in this region. FC, follicular epithelial cell. $\times 18,000$.

Photo.9. Follicle in the middle of stage 2. Electron dense material deposits among the microvilli. The material grows to form the outer layer of the egg envelope (OE). AF appears in the region shown in photo. 8, and extend from under left to upper right in this photograph. FC, follicular epithelial cell; O, oocyte. $\times 7,200$.

る。核は小さくなり、動物極側の細胞質へ移動する。エボン包埋厚切り切片にトルイジンブルー染色を施し光顕観察すると、卵黄粒は濃青色、脂質滴は褐色、表層胞は淡青色、もしくはメタクロマジーを起こし赤紫色を呈する。従って、これら三者の区別は光顕でも容易である。なお、この時期は、卵母細胞内で表層胞と脂質滴の形成が完了し、卵黄形成が最も活発な時である (写真6d)。

卵母細胞内を電顕検索すると、有窓層板複合体 (annulate lamellar complex) の分布が著しい。これは、上記の小型の表層胞、卵黄粒、脂質滴に密接して存在し、層板状に配列した粗面小胞体のリボソームが消失し、規則正しい間隔で無数の孔 (annuli) が形成

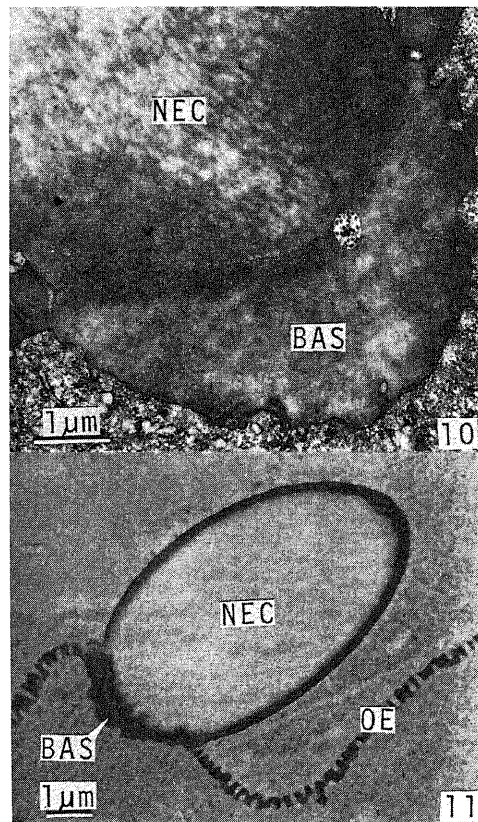


Photo.10. Longitudinal section of the neck segment (NEC) and basal segment (BAS) of AF in the late of stage 2. Cup like BAS which consists of fine granular material, is located in the subside of the oocyte. $\times 10,000$.

Photo.11. Oblique section of AF. The envelope of neck segment (NEC), basal segment (BAS) of AF and the outer layer of the egg envelope (OE) are densely stained only by the block-staining of phospho-tungstic acid. $\times 60,000$.

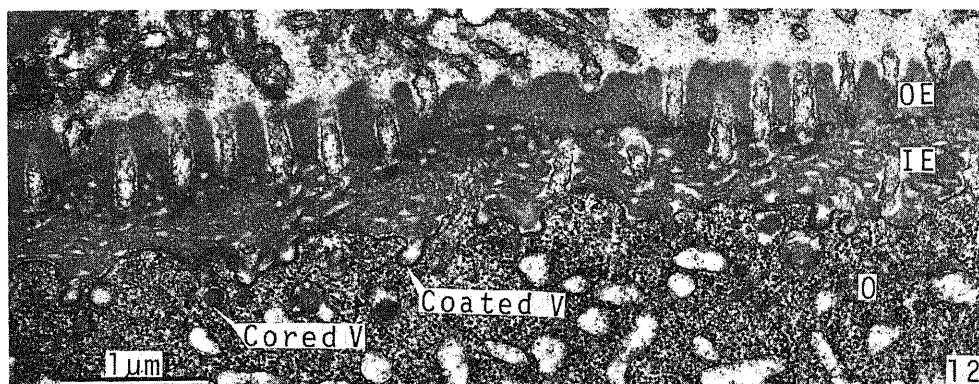


Photo. 12. Oocyte in stage 3 follicle. Outer layer (OE) and inner layer (IE) of the egg envelope appear. Dense cored vesicles (Cored V) and bristle coated vesicles (Coated V) are scattered in the cortical cytoplasm of the oocyte (O). $\times 20,000$.

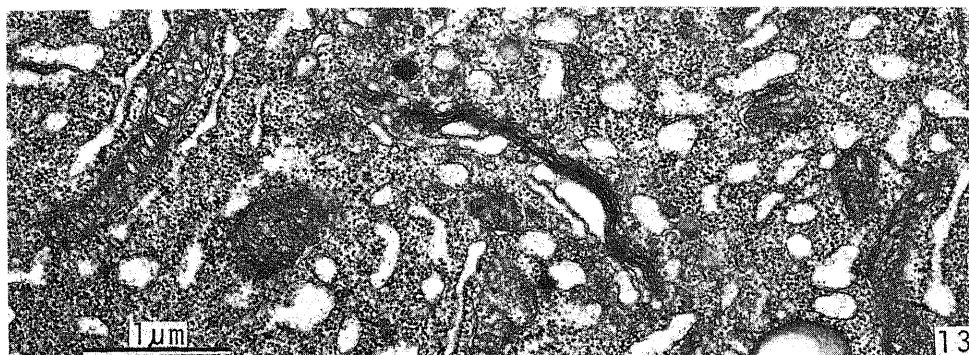


Photo. 13. Golgi complex in the oocyte of stage 3. Numerous vesicles are pinched off from the well developed rough surfaced endoplasmic reticulum. The Golgi vesicle contains electron dense material $\times 20,000$

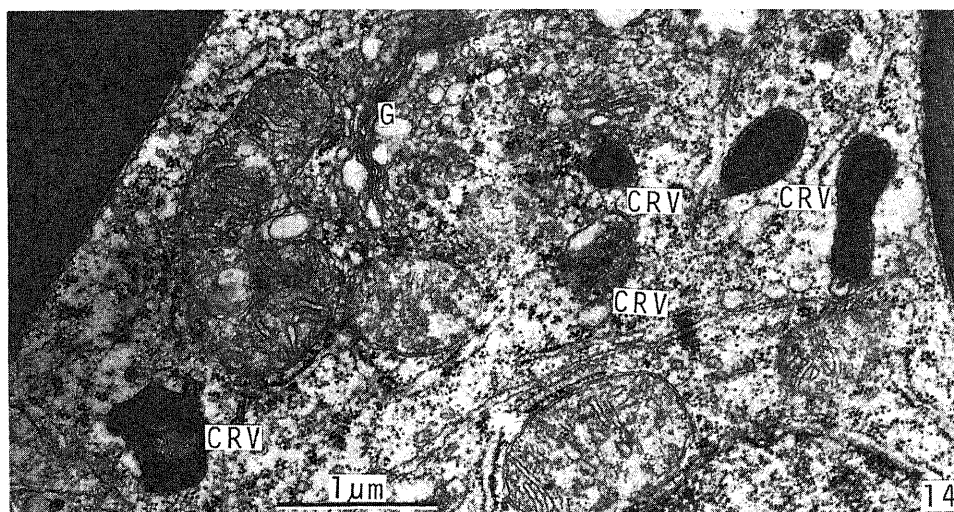


Photo. 14. Golgi complex (G) in the follicular epithelial cell of stage 3. Numerous Golgi vesicles are pinched off from the Golgi complex. Crystal-vesicles (CRV) are scattered near the Golgi area. $\times 21,000$.

されて、層板間の細胞質基質に微細顆粒が沈着したものである。この構造は、卵黄形成との関連が示唆されているものである²⁷⁾。

卵膜内層の厚みが約 $10\mu\text{m}$ に達し、微細線維の集積が緻密となる。卵膜を貫通する孔道が著明で、1つの孔道内に1～3本の卵母細胞と卵胞上皮細胞のマイクロビリーが通っている。両細胞のマイクロビリーが同時にはいつていることもある。卵母細胞の接線に対し直角方向に卵膜を切削すると、両者のマイクロビリーが屈曲することなく貫通している様子が観察される。また、卵母細胞の接線方向に卵膜を切削すると、孔道とマイクロビリーとが猫の目様の構造を呈し、しかも規則正しく配列している。このように、孔道内にマイクロビリーをもつ卵膜は、硬骨魚類卵の特徴である²⁸⁾。

この期のAFの接着点には、厚さ約 $0.3\mu\text{m}$ の卵膜外層があり、その下部では第2期で述べた椀状構造が消失し、卵膜内層に連続した緻密な層が出現している。ここでは、卵膜内層の線維状の帯が約 $0.9\mu\text{m}$ の間隔で4層をなし、孔道は認められない。この椀状構造はAFの基部に相当するが、卵膜内層と連続している。

卵胞上皮細胞の層は、植物極側で約 $10\mu\text{m}$ の厚さを示し、10層以上の細胞層から成る。卵胞上皮細胞の卵膜側半分の細胞どうしは、AFの貫通部を除いて密着しており、わずかの細胞間隙を縫うようにして、電子密度大な卵母細胞のマイクロビリーが走っている。細胞内には、粗面小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置が散在するが、結晶構造を有する小胞は存在しない。

一方、基底膜側半分に位置する卵胞上皮細胞の間隙には、AFの終部が密着しており、細胞内に稀に結晶構造を有する小胞が散在している。ところで、動物極の卵胞上皮細胞層の厚さは約 $5\mu\text{m}$ で、2～3層の細胞から成るにすぎない。

AFの形成が完了し、卵胞上皮細胞に変性像が出現する直前に、動物極・植物極を問わず、殆んどすべての卵胞上皮細胞において、結晶構造を有する小胞の数が著しく少なくなる。代わって、径 $0.14\sim 0.18\mu\text{m}$ の分泌顆粒に類する小顆粒が、細胞質内に無数に出現する。この小顆粒は限界膜をもち、内部に電子密度大な微細顆粒が集積しており、これと限界膜との間に幅約 $0.02\mu\text{m}$ のhaloがある。この顆粒はゴルジ装置に由来し、ゴルジ小胞内に微細顆粒が集積したものである。この顆粒は前記の結晶構造を含む小胞とは全く別種のもので、下垂体前葉²⁹⁾の細胞に見られる顆粒に類似している(写真16)。その後、卵胞上皮細胞は急激に変性に陥る。まず、核が凝縮し、ミトコンドリアが球形に腫大し、粗面小胞体が層板状もしくは渦巻状となり、大小種々の空胞が増加し、全体として細胞が球形の凝集塊となる。卵胞上皮細胞の変性の結果として、細胞間隙が拡大し、間隙部に無定形物質がさらに増加する。この段階で、卵膜と付着毛を保有する成熟卵母細胞が卵胞からはずれやすくなる。

5. 第5期(成熟卵子)

卵子の中心部が卵黄塊のみで占められ、卵黄粒はすべて中央に位置する卵黄塊と癒合する。表層細胞質は

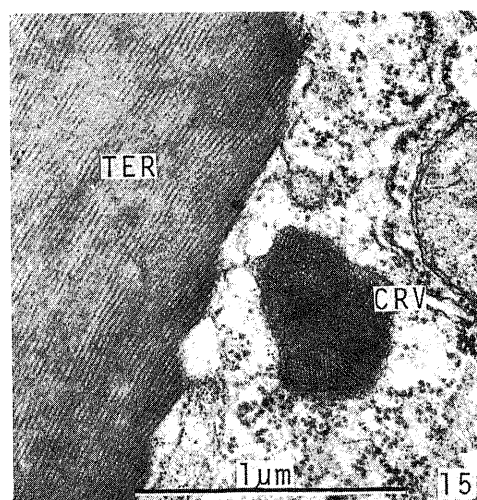


Photo. 15. Crystal-vesicles (CRV) and coated vesicles are located beneath the cell membrane. Terminal segment of AF (TER) comes in contact with CRV. $\times 36,000$.

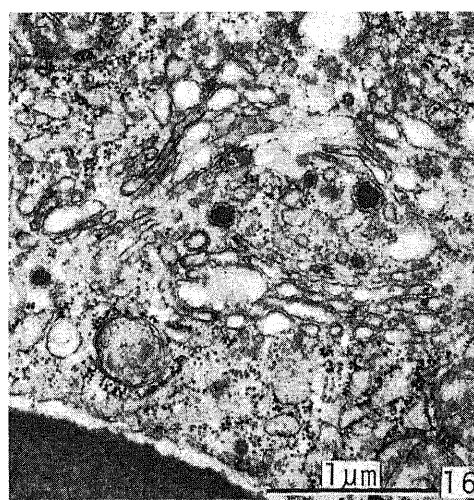


Photo. 16. Numerous vesicles which contain electron-dense material, appear in the follicular epithelial cell just before the ovulation, while CRV can not be observed. $\times 23,000$.

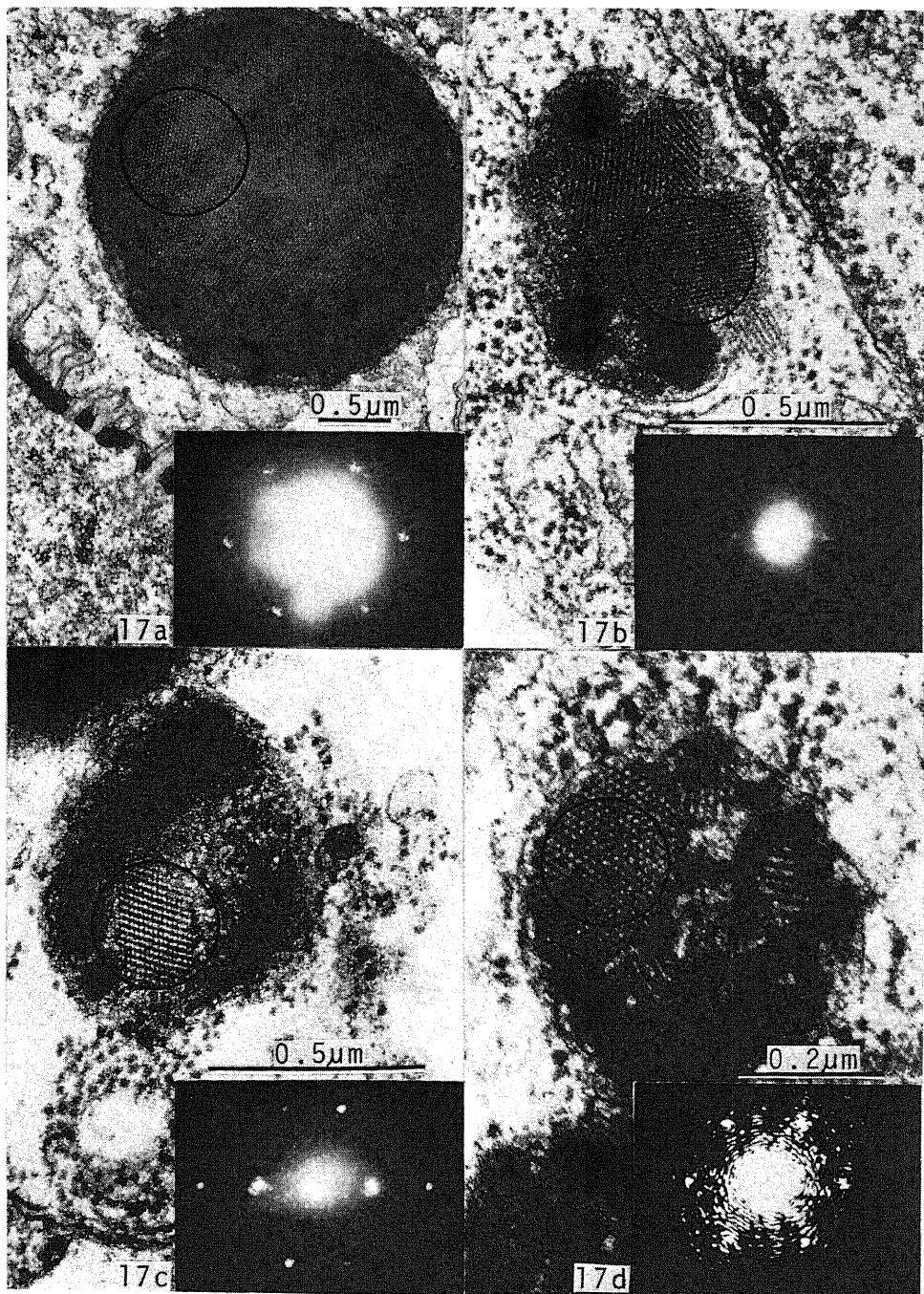


Photo. 17. Several profiles of crystal structures seen in electron micrographs of thin sections of AF (a) and CRV (b-d) and their optical diffraction patterns (insets). The optical diffraction patterns are obtained from the circle areas in the electron micrographs (a, $\times 20,000$; b, $\times 60,000$; c, $\times 60,000$; d, $\times 100,000$). Inset (a) shows a hexagonal pattern, inset (b) a diffraction pattern of bundle of filaments, inset (c) a rhombohedral pattern and inset (d) a hexagonal pattern.

約 20 μm の厚みをなし、表層胞と脂質滴がここにほぼ一層をなして蜂の巣状に分布する (写真 6 e)。

卵膜は約 20 μm に達し、卵膜内層の微細線維の堆積がより緻密となり、約 10 層の帯状の層が識別できる。卵膜外層は、AF 頸部の被膜と連続している。発生期に存在していた基部は、形成が完了した成熟卵子では、もはや存在しない。表層細胞質に第 4 期に存在していた有窓層板複合体がすでに消失し、代わって多胞体 (multivesicular body) が無数に出現する。この多胞体は、卵子の賦活 (activation) の程度が高いほど数が多くなる。

成熟卵はまず卵巣腔へ排卵され、次に卵巣腔壁の高度の神経支配を受けている平滑筋³⁰⁾の収縮によって卵管へ送り出され、泌尿生殖乳頭の尾方に位置する総排泄腔から、植物極側の AF 束によって吊り下げられている。

III. 卵胞上皮細胞内の結晶構造を含む小胞 (CRV)

卵膜と AF が最初に出現する第 2 期では、卵胞上皮細胞間に形成されたばかりの AF の断面が認められる。その内部には、微細小管が規則正しく六方配列をなしている。この期の微細小管は、成熟卵 AF 内の微細小管に比し、その直径がやや小で 180~220 \AA を呈している。この部位の電顕写真について、レーザー光による光回折像を作成すると、写真 17 a, inset, に示すような強い hexagonal pattern が得られ、さらに弱い回折点はその延長上に認められる。微細小管の中心間距離は約 270 \AA 、交叉角度は約 60°である。ところで、形成直後の AF の微細小管は、すべて同一方向に配列しているのではなく、いくつか集団をなして、種々の方向に配列している (写真 17 a)。このことは、まず短い微細小管がつくられ、種々の方向に結晶状にパッキングされ、のちに AF の縦方向に長く連結することを示唆している。

卵母細胞内で表層胞の形成が著明となる第 3 期においては、卵胞上皮細胞内における AF の形成も著明で、限界膜を有する密度大な小胞が無数に出現する。小胞中には、微構造として下記の①~④の像が観察される。著者は、この小胞を crystal-vesicle (以下 CRV と略) と命名する。①電子密度大な径約 40~60 \AA の微細顆粒状物質の集塊。通常、小胞の周辺部の限界膜に近接して位置する (写真 17 b, c)。②径約 40~60 \AA の微細顆粒がジグザグに並んで約 60~90 \AA の微細線維を形成し、それが約 120~180 \AA の間隔で並行に配列して線維束を形成する (写真 17 b)。この電顕像の光回折像からは、並列線維束が等間隔に平面上に並んだ像が呈すると思われる回折点を得られる (写真 17 b, inset)。③並行配列線維の交叉線模様で、交叉角度は得られた

写真によって異なり、約 58°~84°である (写真 17 c)。この電顕像の光回折像からは、明瞭な交叉性の回折点を得られ、交叉角度が約 72°の rhombohedral pattern を呈する (写真 17 c, inset)。しばしば、線維の交叉点に微細顆粒が数個集まって、直径 120~150 \AA の環状をなす小集団を形成している。④電子密度小な環状構造が密にパッキングされている (写真 17 d) もので、六方点の回折点を得られ hexagonal pattern を呈する (写真 17 d, inset)。これは、写真 17 a の inset に示した光回折像に類似し、CRV 内でも微細小管が形成されていることを示唆するものである。また、①~④の構造は単独に存するのではなく、1 個の CRV 内にしばしば共存し、①と②の出現頻度が大きく、③のそれは中間、④のそれは小である。さらに③の交叉線模様において、交叉角度が写真によって異なるのは、超薄切片を電顕観察する際に、種々の異なる傾斜角度で試料が薄切されたものを観察したためであろうと考えられる。

この CRV は、よく発達したゴルジ装置の近傍に出現することが多い。ゴルジ装置からは、径約 0.08 μm の小胞が放出され、CRV に近接している (写真 14)。その後、CRV は成長して、細胞遊離面および突起内に位置するようになり (写真 15)、次第にまわりを細い突起のみで取り囲まれ、突起がはずれると細胞間隙に遊離するようになる。比較的小型の CRV では、漏出分泌の様式で細胞外に放出され、すでに形成されている AF 内の微細小管と連結する。

ところで、卵胞上皮細胞内の CRV は弱拡大で見た場合、一般の組織・細胞におけるリゾゾームに類似しているため、リゾゾーム検出のための標的酵素であるところの酸性フォスファターゼ活性の検出を試みた。その結果、CRV のうちで上記の②、③、④の構造部分に活性が検出されたが、電子密度大な①の構造部分には活性が認められなかった。

IV. ビンブラスチンによる結晶の形成

硫酸ビンブラスチン投与後 19 時間・25 時間および対照のいずれの場合においても、卵胞内には変性した卵母細胞や卵膜、孔道とマイクロビリーの残骸、萎縮した基底膜などの変性像が出現する。CRV を有する卵胞が残存していても、その卵胞上皮細胞内では、ミトコンドリアが球形に変じ、粗面小胞体も層板状や渦巻状の変化を示し、CRV のうち①の構造部分、すなわち電子密度大な微細顆粒状物質の集塊の占める割合が多くなる。また、卵母細胞においても、ミトコンドリアが球形に変化し、脂質滴や空胞が充満し、層板状の粗面小胞体が帯状に広く分布し、さらに小胞体の膜が不鮮明となる傾向を示す (写真 18)。以上の所見を、手術

を施さない健全な卵胞と比較すると、腹腔内に上記の液を注入した場合、卵胞上皮細胞・卵母細胞のいずれにも変性が起こることが明らかである。

ところで、ビンブラスチン投与後 19 時間および 25

時間の卵胞には、上記のほか、次のような特異な所見が得られた。すなわち、卵胞上皮細胞が卵母細胞との結合を失い、AF の集団から外れて卵胞膜を境する基底膜直下に、わずかに一層帯状に取り囲んでいるのみ

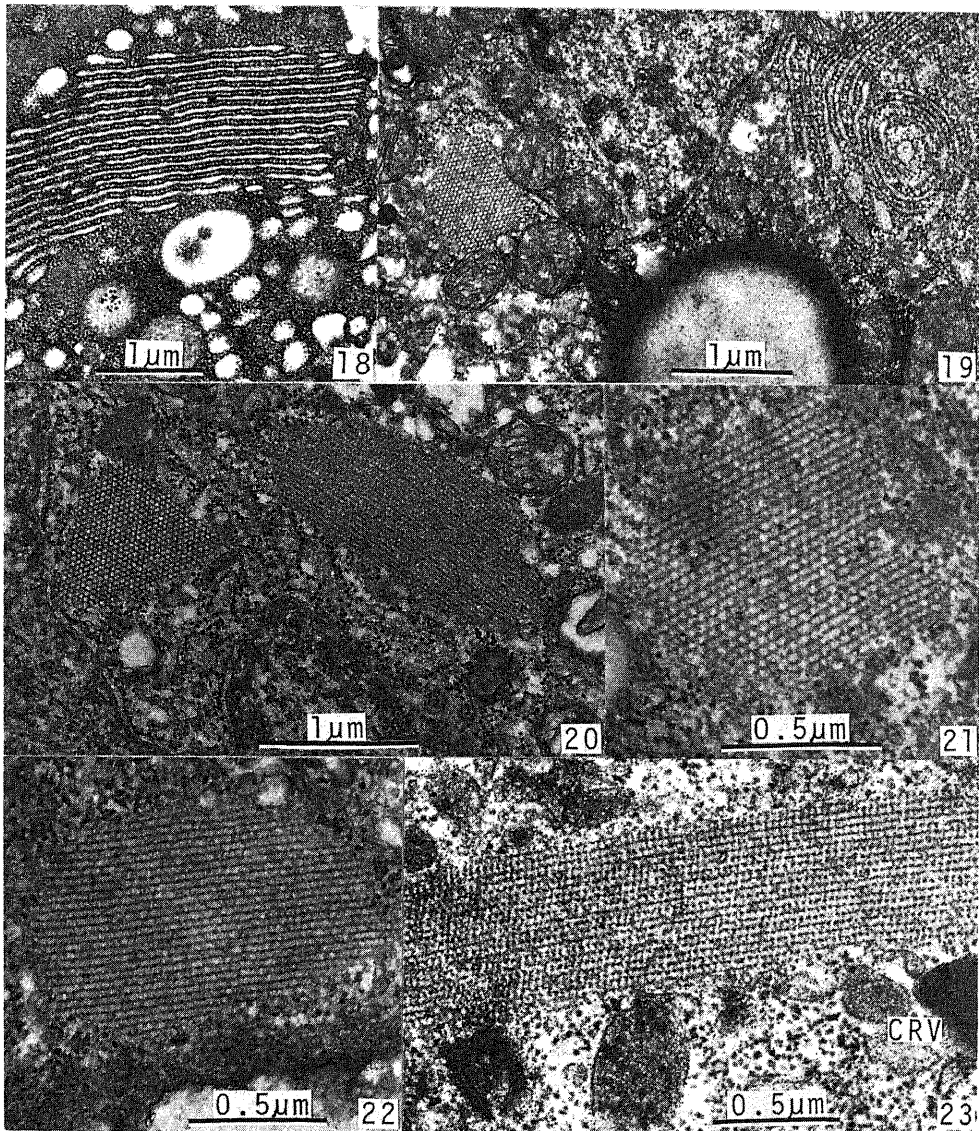


Photo. 18. Oocyte in stage 3 follicle treated with saline injection (control). $\times 14,000$.

Photo. 19 to 23. Follicular epithelial cell 19 hr after treatment with vinblastine sulfate. Photo. 19 is a cross-sectioned vinblastine-tubulin crystal ($\times 16,000$). Photo. 20 shows a cross-sectioned (left) and longitudinally sectioned (right) vinblastine-tubulin crystal ($\times 21,000$). Photo. 21 is an obliquely sectioned vinblastine-tubulin crystal ($\times 42,000$). Photo. 22 is a longitudinally sectioned vinblastine-tubulin crystal; numerous microfilaments are arranged and the interfilamentous space is about 300 \AA in width ($\times 36,000$). Photo. 23 shows a longitudinally sectioned vinblastine-tubulin crystal; parallel arrays of microfilaments 300 \AA apart are seen. This micrograph indicates that these microfilaments are rows of beads of about 100 \AA in diameter. Numerous vesicles and CRV are situated near this crystal. $\times 34,000$.

となる。すなわち、正常な卵胞では卵胞上皮細胞の細胞間隙をAFが走っているのに対し、ビンプラスチンを投与した卵胞では、卵膜の上にAFの集団が載っていて、それを取り囲むように一層の卵胞上皮細胞が存在するにすぎない。さらに、卵胞上皮細胞内には、上述の球形のミトコンドリア、層板状・渦巻状の粗面小胞体が分布するほかに、発達したものでは幅0.6 μm 、長さ4 μm の結晶の形成が認められる(写真19-23)。この結晶は限界膜をもたず、核の近傍、細胞遊離面近く、両者の中間部のいずれの場所にも存在し、局在性を示さない。その横断像では、径約300 \AA の環状構造が、六方格子状に密にパッキングし蜂の巣状を呈し、しばしば環状構造の中心に径約100 \AA の小顆粒が認められる(写真19, 20)。縦断像では、径約100 \AA の微細線維が約300 \AA の間隔で20~30本並行に配列している(写真22)。さらに、一部の縦断像から、この微細線維は径約100 \AA の粒子が数珠状に配列したものであることを示している(写真23)。この結晶の斜断像では、上記の環状構造と並行線維束が同時に観察され(写真21)、このビンプラスチン処理の結果として形成された結晶が、六角柱の集合体であることを示唆している。また、ビンプラスチン処理を施すと、卵胞上皮細胞内のCRVはほとんど消失するか、存在していても他の無数の小胞とともに結晶に近接して位置する。この状態のCRVの限界膜は不著明となっている(写真23)。なお、ビンプラスチン投与後19時間は25時間に比し、結晶の形成が著しい。

考 察

I. 卵膜の形成

今回著者は、卵母細胞の表層部に存在する被覆小胞の内壁に、やや電子密度大な物質が存在することを見出した。この所見は、被覆小胞が、構造上からある種のピノサイトーシス機構をもつことを推測せしめるものである。この被覆小胞が、卵膜の形成に関与するのではないかの疑問が起こるが、著者の所見では、内容物の電子密度が卵膜に比して小さく、しかも卵膜との間に、開口部における物質の連続性が認められないので、被覆小胞は卵膜の形成には直接関与しないと考えられる。被覆小胞は、卵母細胞外からの卵内の合成に必要な物質の取り込みに関与していると推測される。これとは別に、本研究において、卵母細胞の細胞膜直下に、限界膜が平滑で、電子密度大な物質を含む径約0.2~0.3 μm の有芯小胞が無数に観察された。すでにシロメダカにおいて指摘されているように、有芯小胞内の電子密度大な物質は、卵母細胞のゴルジ装置に由来し³¹⁾、またタンパク質と多糖類を含んでいる^{31)~33)}。

今回の検索でも、有芯小胞の内容物が、発生初期では卵膜の外層、後期では内層に連続している所見を得たので、卵膜の形成に関与するものは、この有芯小胞と考えられる。他の硬骨魚類においても、卵膜が卵母細胞によって作られるという著者の見解に一致する報告がなされ、この際、卵胞上皮細胞が卵膜の構成層を変化させる酵素を分泌するのではないかと考えられている³⁴⁾。ところが、外国産のメダカ *Fundulus* において、卵膜の構成層のうち外層のみ、卵胞上皮細胞から作られるとされている³⁴⁾。しかし、今回の著者の所見では、卵膜形成部位の方向に、卵胞上皮細胞から分泌がなされることを思わせるような微構造を見出さなかった。しかも、卵胞上皮細胞相互の間隙に卵膜物質の沈着が認められないので、卵胞上皮細胞からの物質の供給を考えるのは困難である。

今回行なった燐タングステン酸ブロック染色法によると、卵膜外層とそれに続くAF頸部の被膜に燐タングステン酸が沈着していることが見出された。この染色法では、糖タンパクに燐タングステン酸が沈着することは衆知の事実であり、この所見は卵膜とAF頸部の被膜が共通して糖タンパクであることを示すものである。以上から、卵膜外層とそれに続くAF頸部の被膜は、卵膜内層と同様に、卵母細胞の表層部に位置する有芯小胞に由来することを示すものである。

II. 付着毛(AF)の形成

メダカAFの形成は、卵形成初期(第2期)に始まり、卵形成中期(第3期)に最も活発となり、卵形成後期(第4期)において完了する。

今回の検索から、成熟卵子のAF内部には、太さ約220 \AA の微細小管が長軸に並行に配列しているのが観察された。Tsukahara⁵⁾も同様な報告をしているが、Yamamoto⁴⁾の結晶格子構造であるという報告を否定している。しかし、注意深く著者の電顕像を観察すると、形成初期には、卵胞上皮細胞の細胞間隙に存するAF内に、短い微細小管が結晶構造をとりながら種々の方向にパッキングされている。Yamamoto⁴⁾が150 \AA の周期をもつelectron dense parallel cross stripeと表現しているのは、上記の発生初期における著者の所見に一致するもので、AFの形成初期には、まず結晶構造をもつ微細小管が、種々の方向をとって位置することを示している。

AFが卵母細胞表面のどの部に形成されるかに関しては、卵母細胞表面に電子密度大な物質が沈着し、アーチ状に膨隆した部に形成されるとの指摘がなされているにすぎなかった⁴⁾⁵⁾³¹⁾。しかし、アーチ状膨隆の形成機序については何ら報告がない。今回の所見で、此の部では卵母細胞の表面に卵胞上皮細胞が接近して位置

し、約 250 Å の間隙が存するにすぎず、他の部では卵母細胞と卵胞上皮細胞の間に広い空隙が存在することが判明した。さらに、この部の卵母細胞の細胞質は、細胞膜直下が *ektoplasm* の構造をもち、その下部に有芯小胞が多数存在するのが観察された。このことは、卵胞上皮細胞が卵母細胞における AF 形成部位の決定に関与することを暗示している。Kamito³¹⁾は、肉眼および光顕検索によるヒメダカ成熟卵の AF について、卵膜の表面に膨隆した構造を画き、これを AF の basal segment と名付けたが、今回の所見ではこのような知見は得られなかった。AF が形成される部の卵母細胞の表面では、第 2 期の終わり頃から第 3 期にかけて、電子密度大な物質が椀状に卵母細胞の陥凹部に堆積するが、決して膨隆することはない。これは AF 形成予定域に、卵形成期に一時的に出現するもので、第 4 期以降に萎縮し、代わって普通の卵膜内層が存在するにすぎなくなる。以上、AF の発生は図. 1 に示す。

AF の本体をなす微細小管の由来に関しては、従来全く報告がない。今回の著者の検索によって、これが卵胞上皮細胞によって形成されることが明示された。すなわち、第 2 期から第 3 期のはじめに、卵胞上皮細胞において粗面小胞体とゴルジ装置が発達し、ゴルジ装置からは電子密度大な物質を含む小胞が形成され、これが AF に成長する。CRV は前述の①～④の微構造を示し、細胞遊離面に移動し、漏出分泌の様式で、細胞外に結晶様配列をもった微細小管を放出する。また細胞内で小胞の癒合によって大きく成長した微細小管束では、これを囲む細胞質が退縮して細胞外に放出され、本体の形成に付加される。以上、CRV と AF 内の微細小管の関係を図. 2 に示す。Hirose³⁵⁾は著者の CRV に相当すると思われる構造を polymorphous lysosome と呼び、卵胞上皮細胞の変性に関与するリゾソームの一種と考え、またこの構造に卵黄形成に必要な物質の輸送能を推定した。しかし、CRV が多く出現するのは AF の形成の活発な第 3 期であり、卵胞上皮細胞の変性する第 4 期末にはほとんど見られなくなっていることから、CRV が卵胞上皮細胞の変性に関与するとは考えられない。また、Iwamatsu ら³⁶⁾も CRV を lysosome like body と呼んで、コラーゲン分解酵素である ovulatory enzyme を含むのではないかと想像しているが、いずれも根拠に乏しい。Hirose³⁵⁾や Iwamatsu³⁶⁾の検索は、低倍率観察のみにとどまり、CRV 内の AF の微細小管の結晶様配列を見落している。Hirose は著者の CRV 内の電子密度大な物質を卵黄粒の構成成分の輸送形態と推測しているが、これは全くの誤りである。著者らはメダカの卵黄粒が卵母細胞内において微細顆粒の集積として出現することを電顕下に

確認し、メダカ卵黄粒は結晶構造を有しないとすでに報じている²⁷⁾。もし卵母細胞外から卵黄粒の素材が取り込まれるとしても、すくなくとも卵胞上皮細胞内の結晶構造を有する CRV は、卵黄形成とは関係がないと考えるべきである³⁷⁾。

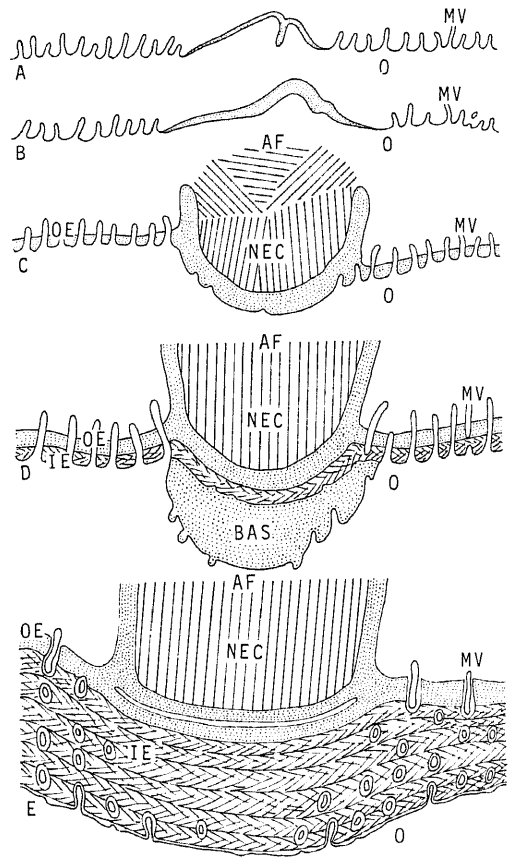


Fig. 1. Diagrammatic representation of the development of attaching filament (AF). AF is composed of basal, neck and terminal segments during the early oogenesis. Basal segment of AF continues to the inner layer of the egg envelope during the late oogenesis, and disappears in the ripe egg. A: Appearance of the outer layer of egg envelope (OE, see C) in the AF locus. B: Thickening of the outer layer of egg envelope (OE, see C) in the AF locus. C: Protrusion of the ridge of the outer layer of egg envelope (OE) and formation of neck segment of AF (NEC) by deposition of microtubules. D: Appearance of both the basal segment of AF (BAS) and the inner layer of egg envelope (IE). E: Disappearance of the basal segment of AF (BAS) and thickening of the inner layer of egg envelope (IE). MV, microvilli; O, oocyte.

リゾソームは、一般に酸性フォスファターゼを含むと言われている。著者は、今回の組織化学的検索で、CRVの一部のものに酸性フォスファターゼを検出した。しかし、酸性フォスファターゼ陽性の細胞内構造がリゾソームと断定することは極めて危険である。CRVの電顕写真では、切片が厚い場合や分解能が悪い

場合、微細小管の結晶構造は必ずしも明確に撮影されるとは限らない。CRVは明らかにリゾソームとは異なる微構造をもった構造である。

Wourms^{21,38)}は魚類 *Cynolebias* で、Anderson³⁹⁾は外国産メダカ *Fundulus* で、それぞれ名称は異なるが、付着毛に相当する構造を電顕で研究し、いずれも微細小

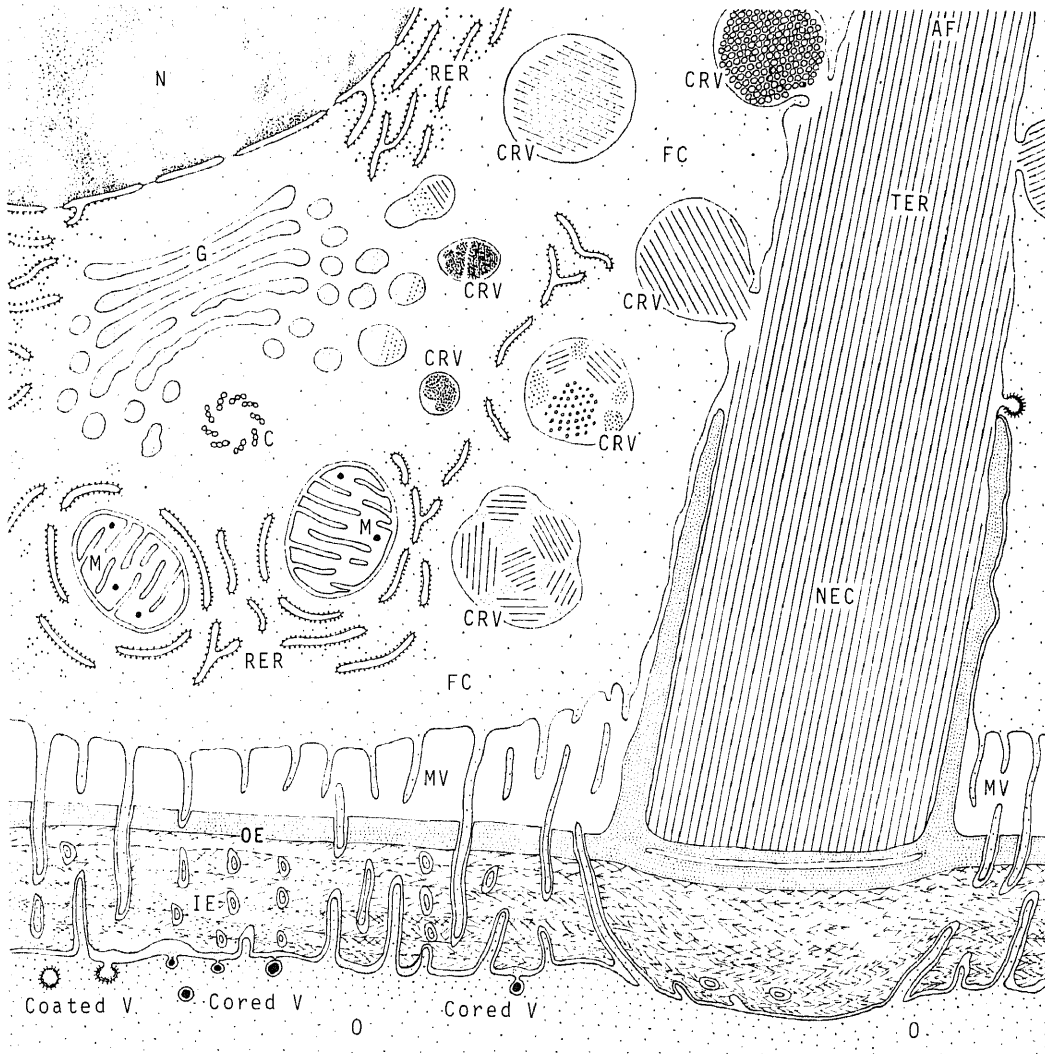


Fig. 2. Diagrammatic representation of the structure and development of attaching filament (AF). Numerous crystal-vesicles (CRV) are pinched off from the Golgi complex of the follicular epithelial cell. Contents of CRV are discharged in the intercellular space by the exocytosis and participate to the formation of AF. Smooth surfaced and cored vesicles (Cored V) and bristle coated vesicles (Coated V) are scattered in the cortex of ooplasm. The contents of cored vesicles constitute the egg envelope. C, centriole; FC, follicular epithelial cell; G, Golgi complex; IE, inner layer of egg envelope; M, mitochondria; MV, microvilli; N, nucleus; NEC, neck segment of AF; O, oocyte; OE, outer layer of egg envelope; RER, rough surfaced endoplasmic reticulum; TER, terminal segment of AF.

管から構成され、卵胞上皮細胞から開口分泌によって形成されるという著者の知見と一致した見解を得ている。しかし彼らの報告は、微細小管の詳細な形成機序についての知見に欠けている。

今回の検索において、CRV 内の結晶構造の光回折の結果から、電顕像のもつ周期性・対称性を解析し、結晶内の分子の配列を推定した。すなわち、電顕像において密度大な顆粒の集合体を呈し、特殊な結晶様構造を示さない①を除けば、チューブリン分子の集合体の電顕像から、②線維束が等間隔に平面上に並んだ像の呈する回折像、③ rhombohedral pattern、④ hexagonal pattern の 3 種の回折像が得られた。次章で詳細に論ずるが、②の回折像は、チューブリン・タンパク粒子が数珠状に連結して protofilament を形成し、それが一定の間隔で配列することを示している。③の rhombohedral pattern を呈するものは、protofilament の隣接する粒子がややずれて位置するため、protofilament に交叉線が観察され、全体としてチューブリン分子が基盤の目のように配列したシートを呈する。これが微細小管の壁となる。④の hexagonal pattern を呈するものは、形成されたばかりの微細小管のパッキングが、横断方向から観察されたものであり、微細小管が六方配列をなすことを示している。Crepeau ら¹⁵⁾は、ブタ脳より分離したチューブリンのペレットから、試験管内でチューブリンのシートを形成し、この構造に光回折を行なったところ、上記の③ rhombohedral pattern と同様な回折像を得ている。

III. 微細小管壁のチューブリン分子

回転重ね焼き法により、メダカ AF の微細小管壁に、径約 50 Å の粒子が横断面にして、13~14 個配列していることを見出したが、この粒子はチューブリンと呼ばれる球状タンパク粒子に相当し、それが数珠状に連なった protofilament が微細小管の長軸に並行に 13~14 本配列していることを示している。この際、隣接する分子の位置が少しずつずれているので、チューブリン分子がラセン状に巻いて微細小管を形成しているとも考えられ⁴⁰⁾、断面像において 13~14 個という数値が得られたものと考えられる。絨毛や鞭毛において、チューブリン分子は骨格筋のアクチン分子の代わりをなし、ミオシン分子と対比できるダイニン分子とともに、チューブリン・ダイニン系が存在し運動を司っている⁴¹⁾。チューブリン・ダイマーは 2 つの異なるモノマーから成り、異型ダイマーを構成している。すなわち、 α チューブリンと β チューブリンで、分子量は $54,000 \pm 1,000$ ダルトンで、両サブユニットは分子量的にはほとんど区別できず、一次構造も共通性が高い。現在のところ、25 番目のアミノ酸残基まで一次構造が

報告されている⁴⁰⁾⁴²⁾。著者の回転重ね焼き法で見出された密度大な顆粒は、チューブリン・ダイマーをその長軸方向から見た影像に相当すると考えられる。

IV. ビンブラスチンによる結晶の形成

キョウチクトウ科に属する *Vinca rosea* L. から、ビンブラスチンとビンクリスチンの 2 種のアルカロイドが抽出され、これらは有糸分裂中期の紡錘糸の形成やアミノ酸の代謝過程を阻害し、細胞の増殖を低下させるため、臨床的に乳癌、神経芽細胞腫、悪性リンパ腫、急性白血病などの化学療法剤の一つとして使われている⁴³⁾。一方、上記の植物アルカロイドを細胞に投与すると、細胞内にアルカロイドとチューブリン分子との結合体である結晶の形成を見るとき、ヒト受精卵細胞¹⁶⁾、ウニ未受精卵¹⁷⁾、マウス精子およびセルトリ細胞¹⁸⁾、ヒト白血病のリンパ芽細胞¹⁹⁾、ネコ迷走神経の神経線維の軸索²⁰⁾、ラット乳腺細胞²¹⁾、ヒト線維芽細胞²²⁾²³⁾などにおいて、結晶の形成が報ぜられている。ビンブラスチンは、ビンクリスチンに比して結晶の形成能が著しい。ビンブラスチンを高濃度に作用させると、破壊的な構造変化、細胞質の膨化、粗面小胞体の減少と空胞化が専ら生起するが、低濃度に作用させると、上記の構造変化のほかに結晶の出現が見られると言われている²¹⁾。ビンブラスチンによる結晶は、vinblastine-tubulin crystal あるいは vinblastine-induced crystal と呼ばれている^{22)~24)}。今回メダカ卵胞において、チューブリン分子の存在場所を確認するため、硫酸ビンブラスチンを腹腔内投与と実験したのであるが、特に第 3 期の卵胞上皮細胞内に結晶の形成が認められた。このことは、AF の形成の著明な第 3 期の卵胞上皮細胞内に多量のチューブリン分子が存在していることを示すものであり、AF の構成成分である微細小管タンパクが卵胞上皮細胞に由来するという著者の検索結果をさらに確証するものである。同時に観察した形成完了の AF 内の微細小管には、ビンブラスチンによる変化が認められなかった。これは、ビンブラスチンによる結晶が、細胞内の微細小管およびチューブリン分子のブールのみから作られるのであり、すでに細胞外に放出され構造の骨格となった微細小管からは作られないためである。また、今回メダカ卵胞上皮細胞内に形成された結晶の縦断像において、見出された径約 100 Å の粒子の数珠状配列は、チューブリン分子の GTP 結合部位にビンブラスチンが結合し²⁵⁾、約 100 Å の球状塊を形成し、これが連結して微細線維が形成されたものと推測される。

結 論

メダカ卵形成期の卵胞の微構造を卵母細胞の発達段

階を追って検索し、付着毛 (attaching filament, AF) の微構造と形成に着目して、次の結果を得た。

1. 卵胞の成熟段階は、第1期から第5期までの5段階に区分される。AFは第2期に出現し始め、その形成は第3期に最も活発となり、第4期末には完了する。

2. AFは、植物極側のものは長く約20本あり、植物極を除く卵膜全体に付着しているものは短く約100本ある。両者の微構造は、ほぼ同一である。

3. 卵形成期のAFは、基部、頸部、終部の3部から構成されており、成熟卵子のAFは、卵膜形成完了とともに基部が消失する結果、頸部と終部の2部から成る。

4. AFの頸部から終部に至るまで、径約220 Åの微細小管が、AFの長軸方向に密にパッキングされている。この微細小管壁には径約50 Åのチューブリンと呼ばれる球状タンパク粒子が、一周に13~14個観察される。頸部のまわりに、電子密度大な微細顆粒の集積から成る被膜が存在し、卵膜外層に連続する。

5. 卵母細胞の表層部の細胞質には、被覆小胞と有芯小胞の2種類の小胞が観察される。前者は卵母細胞外からの物質の取り込みに関与し、後者は卵母細胞内のゴルジ装置に由来し、卵膜の形成に関与する。

6. AFの形成が著しい第3期の卵胞上皮細胞内のゴルジ装置の近傍に、限界膜を有する密度大な径約0.5~0.6 μmの小胞(CRV)が観察される。CRV内には、微細小管タンパクであるチューブリン分子の結晶配列が観察され、細胞外においてAFとなる。

7. 形成直後のAF内の微細小管は、常にその長軸に並行に配列しているとは限らず、しばしば微細小管の結晶構造が種々の方向に位置している。

8. 腹腔内に低濃度の硫酸ビンブラスチンを投与したところ、卵胞上皮細胞内に、いわゆる vinblastine-tubulin crystal が形成され、微細小管の構成タンパクであるチューブリン分子が卵胞上皮細胞内に多量に存在することが証明された。

謝 辞

稿を終えるにあたって、研究の御指導と御校閲を賜った恩師本陣良平教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に際し、いろいろ御協力をいただきました第一解剖学教室の山下利夫助教授、宮下鎮憲技官に深謝いたします。また電子顕微鏡室の西村竹治郎氏、米田邦雄氏、山口稔毅氏、山口浩明氏に厚くお礼を申し上げます。

文 献

1) Kamito, A.: Early development of the Japanese killifish (*Oryzias latipes*), with notes on its

habits. J. Coll. Agric. Tokyo Univ., 10, 21-38 (1928).

2) Wourms, J. P. & Sheldon, H.: Annual fish oogenesis. II. Formation of the secondary egg envelope. Developmental Biol., 50, 355-366 (1976).

3) Guraya, S. S.: Morphology, histochemistry, and biochemistry of human oogenesis and ovulation. Int. Rev. Cytol., 37, 121-151 (1974).

4) Yamamoto, M.: Electron microscopy of fish development. II. Oocyte-follicle cell relationship and formation of chorion in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci., Univ. Tokyo, 10, 123-127 (1963).

5) Tsukahara, J.: Ultrastructural study on the attaching filaments and villi of the oocyte of *Oryzias latipes* during oogenesis. Develop. Growth Differentiation, 13, 173-180 (1971).

6) 岩松鷹司: メダカ卵母細胞の成熟に対する酵素の影響。動物誌, 85, 223-228 (1976).

7) Karnovsky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 27, 137-138 (1965).

8) Dalton, A. J.: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. Anat. Rec., 121, 281 (1955).

9) 佐藤泰山: 超薄切片用鉛染色法の一改良法. J. Electron Microsc., 17, 158-159 (1968).

10) Lawton, D. M. & Johnson, R. P. C.: A superhelical model for the ultrastructure of P-protein tubule in sieve elements of *Nymphoides peltata*. Cytobiologie, 14, 1-17 (1976).

11) Barka, T. & Anderson, P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem., 10, 741-753 (1962).

12) Kushida, H. & Fujita, K.: Block staining with phosphotungstic acid of aldehyde-fixed specimens. J. Electron Microsc., 16, 281-282 (1967).

13) Zebel, C. R. & Beer, M.: The use of heavy metal salts as electron stains. Int. Rev. Cytol., 18, 363-400 (1965).

14) Nagano, T. & Ohtsuki, I.: Reinvestigation of the fine structure of Reinke's crystal in the human testicular interstitial cell. J. Cell Biol., 51, 148-161 (1971).

15) Crepeau, R. H., Mc Ewen, B., Dykes, G. & Edelstein, S.: Structural studies on porcine brain tubulin in extended sheets. J. Mol. Biol., 116, 301-315 (1977).

16) Malawista, S. E. & Sato, H.: Vinblastine

- produces uniaxial, birefringent crystals in starfish oocytes. *J. Cell Biol.*, **42**, 596-599 (1969).
- 17) **Starling, D.**: Two ultrastructurally distinct tubulin paracrystals induced in sea-urchin eggs by vinblastine sulfate. *J. Cell Sci.*, **20**, 79-90 (1976).
- 18) **Wolosewick, J. J. & Bryan, J. H. D.**: Ultrastructural characterization of the manchette microtubules in the seminiferous epithelium of the mouse. *Amer. J. Anat.*, **150**, 301-332 (1977).
- 19) **Krishan, A.**: Ribosome-granular material complexes in human leukemia lymphoblasts exposed to vinblastine sulfate. *J. Ultrastruct. Res.*, **31**, 272-281 (1970).
- 20) **Donso, J. A., Green, L. S., Heller-Bettinger, I. E. & Samson, F. E.**: Action of Vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on axonal fibrillar organelles *in vitro*. *Cancer Res.*, **37**, 1401-1407 (1977).
- 21) **Nickerson, S. C., Smith, J. J. & Keeman, T. W.**: Ultrastructural and biochemical response of rat mammary epithelial cells to vinblastine sulfate. *Europ. J. Cell Biol.*, **23**, 115-121 (1980).
- 22) **Krishan, A. & Hsu, D.**: Observations on the association of herical polyribosome and filaments with vincristine-induced crystals in Earle's L. cell fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **43**, 553-563 (1969).
- 23) **Bensch, K. G. & Malawista, S. E.**: Microtubular crystals in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **40**, 95-107 (1969).
- 24) **Paintrand, M. R. & Pignot, I.**: Navelbine; An ultrastructural study of its effects. *J. Electron Microsc.*, **32**, 115-124 (1983).
- 25) **Berry, R. W. & Shelanski, M. L.**: Interaction of tubulin with vinblastine and guanosine triphosphate. *J. Mol. Biol.*, **71**, 71-80 (1972).
- 26) **Yamamoto, T.**: Changes of the cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* at the time of fertilization. *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, **15**, 272-274 (1939).
- 27) **Yamamoto, M. & Honjin, R.**: On the development of the yolk during the oogenesis of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Electron Microsc.*, **25**, 209 (1976).
- 28) **Götting, K. J.**: Die feinstruktur der hülschichten reifender oocyten von *Agonus cataphractus* L. (Teleostei, Agonidae). *Z. Zellforsch.*, **66**, 405-415 (1965).
- 29) **Kurosuni, K.**: Functional classification of cell types of anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy. *Arch. histol. Jap.*, **29**, 329-362 (1968).
- 30) **Higashimoto, M. & Honjin, R.**: On the ultrastructure of the ovarian wall of medaka, *Oryzias latipes*. *J. Electron Microsc.*, **30**, 267 (1981).
- 31) **Tesoriero, J. V.**: Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes*. I. Morphology of early oogenesis. *J. Ultrastruct. Res.*, **59**, 282-291 (1977).
- 32) **山本 正**: メダカの卵子形成, 特にその細胞化学的研究. *魚類誌*, **4**, 170-181 (1955).
- 33) **小川典子・大井優一**: メダカの卵膜と孵化酵素. *動物誌*, **77**, 151-156 (1968).
- 34) **Anderson, E.**: The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. *J. Cell Biol.*, **35**, 193-212 (1967).
- 35) **Hirose, K.**: The ultrastructure of the ovarian follicle of medaka, *Oryzias latipes*. *Z. Zellforsch.*, **123**, 316-329 (1972).
- 36) **Iwamatsu, T. & Ohta, T.**: On a relationship between oocyte and follicle cells around the time of ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Jap.*, **54**, 17-29 (1981).
- 37) **東元瑞子・本陣良平**: メダカ卵母細胞における卵黄粒の形成と蓄積. *解剖誌*, **56**, 58 (1981).
- 38) **Wourms, J. P.**: Differentiation of a fish egg chorion composed of extracellular microtubules. *Amer. Zool.*, **7**, 754-755 (1967).
- 39) **Anderson, E.**: A study of the fibrillar appendages associated with the surface of eggs of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Anat. Rec.*, **154**, 308-309 (1966).
- 40) **Dustin, P.**: Microtubules, 23-166, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.
- 41) **Mohri, H. & Shimomura, M.**: Comparison of tubulin and actin. *J. Biochem.*, **74**, 209-220 (1973).
- 42) **Lee, J. C. & Frigon, R. P.**: The chemical characterization of calf brain microtubule protein subunits. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7253-7262 (1973).
- 43) **涌井 昭・横山正和**: 抗がん薬, 診断と治療, **71**, 169-175 (1983).

Ultrastructure and Development of Attaching Filaments during the Oogenesis of the Medaka, *Oryzias latipes* Mizuko Higashimoto, Department of Anatomy, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 —J. Jusen Med. Soc., **92**, 875—893 (1983)

Key words: attaching filament, microtubule, oogenesis, vinblastine, medaka

Abstract

The ovarian follicular development and the ultrastructure of attaching filaments (AF) of the medaka (*Oryzias latipes*) have been investigated by the scanning and transmission electron microscopy, using the technique of the rotation analysis of microtubule, optical diffraction, and vinblastine treatment. The egg envelope is composed of a granular outer layer and a fibrous inner one and produced during the oogenesis from the smooth-surfaced vesicles of 100 to 200 nm in diameter, which have a dense core and have been derived from the Golgi complex of the oocyte. AF are conical and filamentous projections attached to the outer layer of the envelope, and composed of basal, neck and terminal segments during oogenesis. The basal segments of AF are made up of fine granular materials as a hemispherical projection, but fuse into the inner layer of egg envelope during late oogenesis, and disappear in the ripe egg. The neck segments of AF are covered with a cylindrical ridge of the outer layer of the egg envelope. The neck and terminal segments of AF are composed of closely packed numerous microtubules which are about 220 Å in diameter. In transverse sections, the wall of the microtubules shows 13 or 14 granular subunits which are about 50 Å in diameter. In longitudinal sections, on the other hand, there appears a linear row of granules in the microtubules. These granules are tubulin molecules which are protein in nature and are embedded in electron-dense amorphous material to form the wall of microtubules. The microtubules of AF are produced in the follicular epithelial cells during oogenesis. The precursors of the microtubules appear as crystal-vesicles (CRV) derived from the Golgi complex in the follicular epithelial cells. Vinblastine-tubulin crystals are produced in the follicular epithelial cells after intraperitoneal injection of vinblastine sulfate. This indicates that the follicular epithelial cells contain a large amount of tubulin molecules during normal oogenesis.